

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 05-099918

(43)Date of publication of application : 23.04.1993

(51)Int.CI.

G01N 33/48  
A61K 35/16  
G01N 1/28  
G01N 33/52

(21)Application number : 03-110267

(22)Date of filing : 15.05.1991

(71)Applicant : BOEHRINGER MANNHEIM GMBH

(72)Inventor : WILK HANS-ERICH

VOGEL PETER

LERCH ROLF

SCHNEIDER ERICH

MARSCHALL ANDREAS

(30)Priority

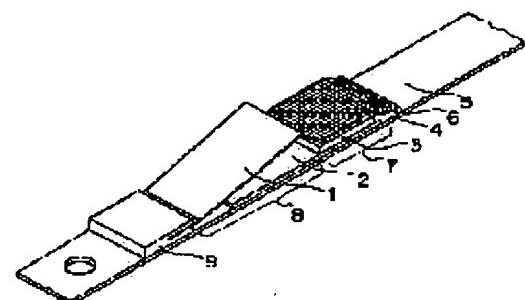
Priority number : 90 4015589 Priority date : 15.05.1990 Priority country : DE

## (54) APPARATUS FOR SEPARATING BLOOD PLASMA FROM WHOLE BLOOD AND ITS USE

### (57)Abstract:

**PURPOSE:** To separate especially, red blood cells from blood plasma by containing glass fibers coated with polyvinyl alcohol or polyvinyl alcohol/ polyvinyl acetate in a fiber-containing layer containing a red blood cell agglutinating material.

**CONSTITUTION:** A moving bed 2 which moves a sample to a testing area 8 from a sample applying area and plasma singly separating area 7 is fixed to inactive carrier foil 5 and the layer 2 uses a glass fiber pad. The glass fiber pad is coated with polyvinyl alcohol or polyvinyl alcohol/polyvinyl acetate. A plasma separating layer 3 partially covers the moving layer 2 and a protective layer 4 is formed on the separating layer 3 and prevents the layer 3 from being damaged while the sample is applied. The layers 4 and 3 are fixed to the foil 5. Carrier foil 1 containing a reagent required for measurement is stuck to one side of the layer 2. The sample for analyzing blood for components is applied to the layer 4. The blood infiltrates into the layer 3 and the layer 3 holds agglutinated red blood cells.



### LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 15.05.1991

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 2057283

[Date of registration] 23.05.1996

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C) 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-99918

(43)公開日 平成5年(1993)4月23日

(51)Int.Cl.<sup>5</sup>

識別記号

序内整理番号

F I

技術表示箇所

G 01 N 33/48

D 7055-2 J

A 61 K 35/16

9165-4 C

G 01 N 1/28

J 8105-2 J

33/52

B 7055-2 J

審査請求 有 請求項の数3(全10頁)

(21)出願番号

特願平3-110267

(22)出願日

平成3年(1991)5月15日

(31)優先権主張番号 P 4 0 1 5 5 8 9. 7

(32)優先日 1990年5月15日

(33)優先権主張国 ドイツ(DE)

(71)出願人 591005589

ベーリンガー・マンハイム・ゲゼルシヤフト・ミット・ベシュレンクテル・ハフツング

BOEHRINGER MANNHEIM  
GESELLSCHAFT MIT B  
ESCHRANKTER HAFTUNG  
ドイツ連邦共和国6800マンハイム31、ザン  
トホーフアーストラーゼ116番

(72)発明者 ハンス・エリッヒ・ヴィルク

ドイツ連邦共和国デー-6141アインハウゼン、テオドア・ホイス・シュトラーゼ2番

(74)代理人 弁理士 青山 葵 (外1名)

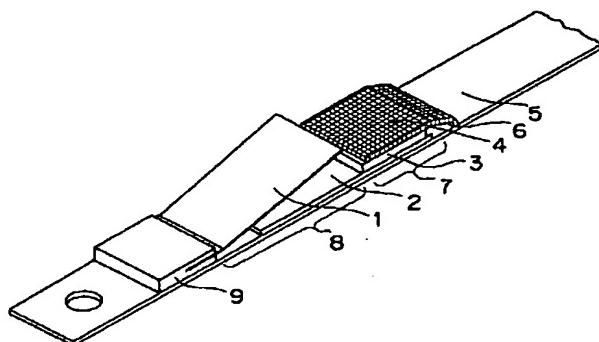
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 全血から血漿を分離するための器具およびその使用

(57)【要約】

【目的】 血漿から未希釈血液の細胞成分、特に赤血球を分離することができる可能性を見いだすこと、およびこの分離の際に溶解を生じさせないこと。

【構成】 赤血球凝集物質を含有している繊維含有層によって全血から血漿を分離するための器具およびその使用に関するものであり、該繊維含有層がポリビニルアルコールまたはポリビニルアルコール/ポリ酢酸ビニルで被覆されているガラス繊維を含有することを特徴とする。また、血液成分測定用試験担体ならびに本発明の器具を使用する全血から分離するための方法。



### 【特許請求の範囲】

【請求項1】 赤血球凝集化物質を含む纖維含有層を有し、纖維含有層がポリビニルアルコールまたはポリビニルアルコール／ポリ酢酸ビニルで被覆されたガラス纖維を含むことを特徴とする全血から血漿を分離するための器具。

【請求項2】 全血を赤血球凝集化層と接触させ、赤血球を纖維含有層によって保持させる全血から血漿を分離するための方法であって、纖維含有層としてガラス纖維を含有している層を使用し、ガラス纖維がポリビニルアルコールまたはポリビニルアルコール／ポリ酢酸ビニルによって被覆されていることを特徴とする分離方法。

【請求項3】 血漿単離域および試験域を含み、該血漿単離域が請求項1記載の器具を含むことを特徴とする血液成分の測定用試験担体。

### 【発明の詳細な説明】

#### 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、赤血球を凝集させる物質を含む纖維を含有している層を有する、全血から血漿を分離するための器具およびその使用に関する。さらに、本発明は、赤血球を凝集させる物質と全血を接触させて、纖維を含有している層によって赤血球を引き止めることを特徴とする全血から血漿を分離する方法に関する。また、本発明は、血漿を単離する帯域および試験域を含む血液成分の測定用試験担体に関する。最後に、本発明は、ポリビニルアルコールまたはポリビニルアルコール／ポリ酢酸ビニルで被覆されたガラス纖維の使用に関する。

#### 【0002】

【従来の技術】 赤血球は、しばしば、それ自体の色のために全血の臨床学的・化学的試験、特に比色試験を妨害する。全血から得られる血漿および血清は、溶解した血液成分の分析に関する最も重要な試料物質である。一般に、全血から血清または血漿を分離するのに遠心分離が使用される。しかしながら、これは、特に少量の試料を使用する場合に問題があり、さらに遠心分離によって沈降するいわゆる血餅から上澄み液を分離するのは常に容易であるとは限らない。

【0003】 全血の使用は、迅速診断装置において特に困難である。迅速診断装置は、試薬を含有している吸収性物質または膨潤可能物質からなり、このようなもの、例えば試薬を含浸させたかまたは固体担体上に存在する紙と試験しようとする物質とを接觸させて、通常の非常に短い反応によって、初期の迅速診断装置の測定可能な変化、例えば、好ましくは可視的に評価されるかまたは反射光測定法によって測定し得る色の変化が起こる。血液のような不透明なまたは有色の溶液は測定を有意に妨害する。したがって、特に迅速診断装置に関して全血から血漿を分離するのに使用することができる装置を提供するためおよび方法を改良するために多くの試みが為さ

れたきた。

【0004】 全血の分析用の多くの装置のうち1つが欧洲特許出願公告EP-B-0057110に開示されている。この方法において、実質的に非湿潤性物質上に固定されている赤血球を凝集させる試薬を使用する。担体としてビーズを使用するのが好ましい。ポリアクリラミドは、これに関する好ましい物質である。

【0005】 米国特許US-A-3,146,163およびドイツ特許出願公開DE-A-1498577においては、血漿の分離のために、全血を、植物性赤血球凝集素のような赤血球凝集素で被覆された物質に適用する。可能な担体物質としてプラスチックおよび厚紙のような繊維性物質が挙げられている。

【0006】 ドイツ特許出願公開DE-A-3441149には、レクチンを含浸させたマトリックスに全血を適用し、血漿または血清を単離することからなる全血の分離方法が開示されている。マトリックスは、40%までの流体流に対する相対抵抗性を有する吸収性物質からなる。纖維性構造または纖維構造およびできる限り小さい流体流に対する抵抗性を有するマトリックスが挙げられる。好ましい物質として、綿およびビスコース纖維およびセルロース物質が挙げられる。しかしながら、この方法の明らかな欠点は、分離した血漿または血清を希釈剤でマトリックスから洗浄しなければならないことである。

【0007】 欧州特許出願公開EP-A-0295526には、全血から血漿または血清を分離する別の装置が開示されている。該装置は、血球を凝集させる試薬で処理されている吸収性マトリックスを含んでいる。血球を凝集させる試薬として、トロンビンまたはレクチンが挙げられる。吸収性マトリックスとしては、疎水性粉末、スポンジ様およびクレイ様物質、纖維およびポリマーが推奨されている。纖維含有紙は、ポリマーとしても認識される。濾紙は、好ましいマトリックスである。

【0008】 欧州特許出願EP-A-0194502の物質は、レクチンを含浸させた吸収性マトリックスを分離層として使用する全血から血漿または血清を分離するための試薬である。

【0009】 欧州特許出願公開EP-A-0325413には、全血と接觸させると赤血球が結合するカチオン性表面を形成するようにポリカチオンを吸収性固体物質上に固定することが開示されている。好ましい担体物質は紙である。

【0010】 欧州特許出願公開EP-A-0133895には、いくつかの極性基を有する物質を含浸させた吸収性多孔質物質を使用して、全血から血漿を分離することが開示されている。例えば、とりわけ、紙、パッドおよび纖維が一般的に挙げられている。

【0011】 欧州特許出願公開EP-A-0305803には、赤血球凝集化抗体および所望によりレクチンを含んでい

る繊維含有層過層、またはガラス繊維の濾過層およびレクチンからなる赤血球含有体液から血球を分離するための装置が開示されている。

【0012】欧州特許出願公開EP-A-0269240は、赤血球凝集剤を担持することができるガラス繊維からなるフィルターと全血を接触させる、赤血球から血漿を分離するための装置に関するものである。

【0013】従来技術によって公知である全血分離方法のうち、特に、全血を赤血球凝集化物質と接触させ、赤血球を繊維含有層によって保持させる装置が実践的に重要なことが分かった。しかしながら、このような赤血球分離層の共通の欠点は、希釈した試料を使用する場合に赤血球が充分に分離されるだけであること、および／または分離しようとする赤血球を分離層と接触させると溶血が生じることである。全血試料中の赤血球を分離の前にまず希釈しなければならない場合、これは、冗長な付加工程であり、行われた測定の結果を誤らせ得る。故に、希釈工程は、実際には望ましくない。

【0014】溶血は、赤血球からヘモグロビンを放出させ、したがって、血漿または血清を脱色させる。このような脱色は、比色試験を相当に妨害し得る。さらに、溶血の際に、他の赤血球成分が血漿中に放出される。ヘモグロビンによる脱色が比色試験を妨害しない場合であっても、特定のパラメーターの測定は、僅かな溶血によってさえ相當に不正確になる。例えば、カリウムイオンは、溶血の際に赤血球から放出され、その結果、血漿中のカリウムの測定は、完全に不正確になり得る。例えば、欧州特許出願公開EP-A-0045476から、未希釈の全血から赤血球を良好に分離するために使用し得るガラス繊維によって全血から血漿または血清を分離するための試薬および方法が知られている。しかしながら、ガラスによって生じる赤血球の僅かな溶血は、全血からのカリウムの測定を不正確にするのに充分である。

#### 【0015】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、血漿から未希釈の血液の細胞成分、特に赤血球を分離することができる可能性を見いだすこと、そしてこの分離の際に溶解を生じさせないことである。分離は、特に、迅速診断装置においても可能であるべきである。

#### 【0016】

【課題を解決するための手段】この目的は、特許請求の範囲において特徴付けられる発明によって達成される。

【0017】本発明は、赤血球凝集化物質を含む繊維含有層を含み、該繊維含有層のガラス繊維がポリビニアルコールまたはポリビニアルコール／ポリ酢酸ビニルで被覆されていることを特徴とする全血から血漿を分離するための器具を提供する。

【0018】本発明は、また、全血を赤血球凝集化物質と接触させ、赤血球がガラス繊維含有層を通過する間に保持され、該ガラス繊維含有層のガラス繊維がポリビニル

アルコールまたはポリビニアルコール／ポリ酢酸ビニルで被覆されていることを特徴とする全血から血漿を分離するための方法を提供する。

【0019】さらに、本発明は、血漿を単離する帯域および試験域を含み、該血漿単離域が赤血球凝集化物質を担持しているガラス繊維含有層からなる器具を含んでおり、この層のガラス繊維がポリビニアルコールまたはポリビニアルコール／ポリ酢酸ビニルで被覆されていることを特徴とする血液成分測定用試験担体を提供する。

【0020】さらにまた、本発明は、全血からの血漿の分離のための、赤血球を凝集させる物質を担持しているポリビニアルコールまたはポリビニアルコール／ポリ酢酸ビニルで被覆されているガラス繊維の使用である。

【0021】驚くことに、本発明によって、ガラス繊維がポリビニアルコールまたはポリビニアルコール／ポリ酢酸ビニルで被覆されており、かつ赤血球を凝集させる物質を担持しているガラス繊維層が、この方法で実質的に溶血を生じずに、血漿から未希釈全血の細胞成分を非常に良好に分離するのに適していることが分かった。

【0022】ポリビニアルコールまたはポリビニアルコール／ポリ酢酸ビニルで塗布されているガラス繊維およびこのような繊維を含有している層は欧州特許出願公開EP-A-0239002から公知であるが、該特許出願において、この被覆は、単に、該繊維を凝固に対してニュートラルにさせるだけである。該公開明細書は、ポリビニアルコール／ポリ酢酸ビニルの被覆が溶血を抑制する効果を有し得るということを示していない。さらに、赤血球凝集物質が全く開示されていない。

【0023】欧州特許出願公開EP-A-0353570には、ポリビニアルコールで被覆されているガラスからなる、試薬によって分離できる含浸担体マトリックスが開示されている。該担体マトリックスは、血液から血漿を分離するためには使用されない。被覆されたガラスが赤血球凝集化物質を担持することができるという事実は、この公開明細書には教示されていない。溶血については、考慮されていない。

【0024】本発明に関して、様々な直径のガラス繊維を使用することができる。該ガラス物質は、アルカリ含有またはアルカリ不含硼珪酸ガラスまたは純粋な石英ガラスからなり得る。他の技術的なガラス繊維物質、例えば、硼素不含アルカリガラス、結晶ガラス、鉛ガラスなどは、必要な繊維サイズが市販品として入手可能ではなく、したがって、試験できなかつた。しかしながら、それらは適していると推測される。ガラス繊維の平均直径は、 $0.5\text{ }\mu\text{m}$ ～ $2.5\text{ }\mu\text{m}$ 、特に $0.5\text{ }\mu\text{m}$ ～ $1.5\text{ }\mu\text{m}$ であり得る。繊維直径は、それらの製造法によって広範に変化することができるが、例外の場合、それらは、 $10\text{ }\mu$

mの上限を越えるべきである。それらの長さは、積み重ねのタイプによって限定されるだけであり、他に影響はない。積み重ねのタイプに依存して、0.1～0.5、通常、0.2～0.4 g/cm<sup>3</sup>の密度が好都合であることが分かった。ガラス繊維は、ゆるく積み重ねた形態ならびに紙、パッドまたはフェルトの形態および外部鋳型によって保持されることによる所望の形状で使用することができる。

【0025】ポリビニルアルコールは、通常、生成物の所望の性質に依存して完全または部分的なケン化が行われるケン化によって、ポリ酢酸ビニルから製造される。本発明の目的のために、完全または部分的にケン化された生成物が使用され得る。多量に商業的に入手可能であるポリビニルアルコールは、特に、通常10000～100000であり、いくつかの特別な場合、非常に高い値を達し得るそれらの平均分子量において、ならびにアセチル基の残存含有量において異なる。アセチル基約5～15%、特に約10%を含有している低分子量化合物は、水に最も容易に溶解し、これに反して、高分子量および／またはより多くアセチルを含有する生成物は、水にあまり溶解しない。さらに、ポリビニルアルコール鎖の間の相互作用は、溶解性への影響を有する。個々の領域において該ポリマー鎖が平行に配置される結果、“結晶”帯域が形成され、これによって、配向の傾向が大きいほど鎖の構造が不均一になり、大部分が配向を妨害するアセチル基の割合が小さくなる。結果として、“結晶化度”は、97～100モル%のケン化度で、すなわち、3～0モル%のアセチル化度で特に実質的に増大し、これによって、反対に、冷水中の溶解性が非常に減少する。

【0026】さらに、水溶性は、アルコールの基のアルデヒドによる後処理(アセタール化)によって、または他の化学的転換によって減少し得る。特に冷水中で非常に僅かな溶解性を有するこれらポリビニルアルコールは、本発明で使用し得る。該生成物は、水にゆっくりと溶解するかまたは20°Cで全く溶解しない。しかしながら、50～100°Cの温度で、特に、60°C以上の温度で、水への溶解性は、不都合ではない。

【0027】本発明において、ガラスの全表面を覆うような方法で、全血から血漿を分離するために使用されるガラス繊維をポリビニルアルコールまたはポリビニルアルコール／ポリ酢酸ビニル層で被覆する。これに関して、ガラス繊維に対して比較的少量、特に約0.5～2.0重量%、好ましくは1～10重量%のポリビニルアルコールまたはポリビニルアルコール／ポリ酢酸ビニルで充分である。

【0028】有意に溶血せずかつ血液型に依存しない濃度で、繊維層によって血液から分離され得るような方法で、赤血球を大きい凝塊に凝集させることができる全ての物質が、赤血球凝集化物質を有する本発明のポリビニ

ルアルコールまたはポリビニルアルコール／ポリ酢酸ビニル被覆ガラス繊維を被覆するのに基本的に適している。これに関して、カチオンポリマー、レクチン、赤血球に対する抗体または個々の物質もしくはこれら物質の全ての混合物が使用されるのが好ましい。

【0029】カチオンポリマーとして、分子当たり10以上、好ましくは20以上の陽電荷を有する全ての有機または無機ポリマーが大体において適している。N,N,N',N'-テトラメチル-1,6-ヘキサンジアミンおよび1,3-ジプロモプロパン(ポリブレン(Polybre nR))、ポリエチレンイミン(ポリミン(PolyminR))およびポリビペリジン塩、例えば、ポリ塩化ジメチルピペリジンが特に好ましいことが分かった。特に好ましくは、ポリブレン(PolybrenR)であり、特に6000以下の分子量を有するものである。

【0030】使用し得るレクチンは、とりわけ、全てのヒト赤血球と結合することができ、したがって、それらを凝集させるものであり、すなわち、血液型特異性ではない。ジャガイモ(Solanum tuberosum)、トマト(Lycopersicon esculentum)、リシナス・コミュニス(Ricinus communis)またはアメリカヤマゴボウ(Phytolacca americana)(ケルメス・ベリー(kermes berry))のレクチンを、個々に、または上記のいくつもしくは全てを組み合わせて使用するのが好ましい。

【0031】本発明で使用され得る抗体は、赤血球の表面構造に結合する。該抗体は、好ましくは血液型非特異性であるべきであり、さもなければ、抗体を存在する血液試料に適合させなければならない。モノクローナルまたはポリクローナル抗体を使用することができ、それによって、製造がより“簡単”であるポリクローナル抗体の使用が適切である。

【0032】本発明において、ガラス繊維パッドは、全血から血漿を分離するための器具として特に好都合であることが分かった。本発明のガラス繊維パッドの製造は、水中でポリビニルアルコールによって、または適切な有機溶媒によって、適切なガラス繊維パッドをさらに処理し、好ましくは60°C以上、特に90～140°Cの温度でそれを乾燥させるか、あるいは、ガラス繊維パッドの製造の間にポリビニルアルコールまたはポリビニルアルコール／ポリ酢酸ビニルを添加することによって行うことができる。ガラス繊維パッドは、平均直径0.5～2.5 μm、特に0.5および1.5 μmの乾燥し纏れたガラス繊維を非常に過剰量の水に懸濁し、この方法で分離し、この“パット”を通常の紙製造と同様の方法でこれに関する通常の機械によって薄層中に形成し、乾燥させるような方法で製造される。該パットに添加したポリビニルアルコール粉末または繊維は、ガラス繊維を懸濁させた後に混合物中に不均一に分散され、該パッドの製造において、それらを、その後のパッドの乾燥の間にガラス繊維上に不均一な塗膜を形成するような程度に、溶

解または溶融させる。

【0033】赤血球凝集化物質をガラス繊維含有層に適用するために、後者に適当な物質の溶液を含浸させるのが好ましい。例えば、含浸溶液をガラス繊維層に適用するかまたはこれを含浸溶液中に浸漬させる。

【0034】ガラス繊維がポリビニルアルコールまたはポリビニルアルコール／ポリ酢酸ビニルで被覆されているガラス繊維パッドは、未処理ガラス繊維パッドと比較して湿潤強度が増大する。特に技術的な大規模の製造に必要な量およびサイズの未処理ガラス繊維パッドは、含浸溶液中に浸漬することができず、それらの湿潤強度が低いために引き裂かれずに試薬を含浸することができないが、これは、ポリビニルアルコールまたはポリビニルアルコール／ポリ酢酸ビニル被覆ガラス繊維パッドを用いて容易に行うことができる。できる限りホモジニアスであるポリビニルアルコールまたはポリビニルアルコール／ポリ酢酸ビニル被覆ガラス繊維パッドへの赤血球凝集化物質の含浸を達成するために、このように前処理されたガラス繊維パッドは、適用しようとする物質の溶液中に浸漬することによって好都合に含浸させることができる。

【0035】適度に赤血球を凝集する物質を溶解する溶媒として、この物質の性質への陰性の影響を有さず、ポリビニルアルコールまたはポリビニルアルコール／ポリ酢酸ビニルによって被覆されたガラス繊維パッドに赤血球凝集化物質を含浸させた後、この方法で製造されたフィルター物質の血漿分離特性を損なわないような方法で再度除去し得る如何なる液体を選択することができる。大部分の場合、選択される溶媒は、水または水性緩衝溶液である。

【0036】赤血球凝集化物質に関する溶媒を分離除去しなければならない場合に、含浸工程の後に乾燥工程を続ける。これは、水が溶媒として使用される場合に慣例的である。この場合、乾燥工程が行われる温度および赤血球凝集化物質に依存する時間の長さを決定しなければならない。一般に、温度が40～90°Cの間であり、乾燥時間は、1～10分間である。

【0037】本発明への適用に関して、ポリビニルアルコールまたはポリビニルアルコール／ポリ酢酸ビニルで処理されたガラス繊維層の表面上の赤血球凝集化物質の濃度は、凝集効果を有する個々の物質のタイプおよび血漿を単離しようとする血液の量に依存する。しかしながら、如何なる場合も血漿の完全な分離を可能にするために充分に高くなければならないが、妨害溶血が生じるほど高くてはいけない。これは、血液を、様々な濃度の赤血球凝集化物質を含浸させたガラス繊維層に適用し、重力および／または毛管力によってこの層を通過する血漿が赤血球またはヘモグロビンを含有しているかを吟味する簡単な実験によって測定され得る。このような実験は、実施例2と同様に行うことができる。被覆したガラ

ス繊維層1グラム当たりの陽電荷の数は、使用するカチオンポリマーの濃度を特徴付けるのに使用されることが分かった。本発明における量は、1グラム当たり $10^{18}$ ～ $10^{21}$ 電荷、好ましくは1グラム当たり $5 \times 10^{19}$ ～ $10^{21}$ 電荷である。

【0038】全血から血漿を分離するための本発明の器具は、ポリビニルアルコールまたはポリビニルアルコール／ポリ酢酸ビニルで被覆されておりかつカチオンポリマーを担持しており、ゆるく積み重ねたか、または紙、パッドもしくはフェルトの形態であるガラス繊維からなり得る。しかしながら、それらは、外部構造によって保持されることによって所望の形態で使用されてもよい。例えば、遠心分離せずに簡単な通過によって血液から血漿を単離するために、これに関して適当に処理したガラス繊維を充填したカラム、ヌツェフィルターまたは他の適切な容器を使用することができる。

【0039】血漿単離および試験域を有する血液成分測定用試験担体における血漿単離の技術分野において、特に本発明の器具、とりわけ、ガラス繊維がポリビニルアルコールまたはポリビニルアルコール／ポリ酢酸ビニルで被覆されており、赤血球凝集化物質を担持しているガラス繊維パッドを使用することができる。このような試験担体の可能な配置の例は、例えば欧州特許出願公開EP-A-0045476、EP-A-0239002またはEP-A-0133895に開示されている試薬と同様に可能であり、本明細書に引用している。

【0040】図1において、本発明の血漿分離層を含んでいる試験担体のタイプを例として示す。

【0041】図2および図3は、試料液体として血液および血漿に関する様々な分離層を有する図1の試験担体を使用する反射率[%]および分析物濃度[mg/リットル]の相互関係に関する関数曲線を示す。

【0042】図2に関して、分離層として、欧州特許出願公開EP-A-0239002の2%ポリビニルアルコールと一緒にガラス繊維を用いた。

【0043】図3に関して、2%ポリビニルアルコールおよび赤血球に対する抗体を有する本発明のガラス繊維パッドを使用した。

【0044】図1：試料適用域および血漿単離域(7)から試験域(8)中に試料液を移動させる移動層(2)は、不活性担体ホイル(5)、例えばプラスチックホイルに固定される。大体において、移動層(2)としては、試験しようとする液体を試料適用域(7)から試験域(8)中に移動させることができ、この工程において、分析を害するような方法でそれを変えない全ての物質が適している。移動層(2)としてガラス繊維パッドを使用するのが特に好ましい。本発明の血漿分離層(3)は、移動層(2)を部分的に覆っている。保護層(4)は、分離層(3)の上に設置されており、例えばピペットで、試料適用の間に分離層(3)の損傷を防止しようとする。不活性物質、例えばブ

ラスチックのネットがこのために価値があることが分かった。保護層(4)および分離層(3)は、不活性担体ホイル(5)に固定されている。これは、例えば、熱間硬化型接着剤のストリップ(6)によって行われ得る。測定を行うのに必要な試薬を含むフィルム層を有する透明なプラスチックからなる担体ホイル(1)は、移動層(2)の片側に接着されている。これは、好ましくは、接着部(9)、例えば熱間硬化型接着剤のストリップによって行われる。フィルム層(1)は、不活性担体ホイル(5)に向かって透明担体ホイルを押すことによって液体移動を可能にするような方法で移動層(2)と接触させることができるように位置決定する。

【0045】血液中の分析物の測定を行うために、試料を保護層(4)に適用する。血液が分離層(3)中に浸透し、赤血球を凝固し保持する。血球が血漿または血清から分離される。この方法で得られた血漿は、毛管力によって試験域(8)中に吸収される。移動層(2)における血漿は、試薬層(1)を有する担体ホイル上の圧力によって試薬層と接触させられ、液体は試薬層中に浸透し、測定反応を起こす。比色測定反応の場合、該反応は、例え

a) ガラス繊維パッドの製造

脱イオン水

ガラス繊維タイプ108A(ジョン・マンビル

(John Manville)、アメリカ合衆国)

出発物質としてポリビニルアルコール、

タイプ クラロン(Kuralon)VPB 105-2

(ローテックス・テキスタイル・ゲゼルシャフト・

ミット・ベシュレンクテル・ハフツング(Rohtex

Textil GmbH)、ドイツ連邦共和国)

【0051】抄紙機として、傾斜スクリーン機(ホイス(Voith)、ドイツ連邦共和国ハイデンハイム)を使用する。水に懸濁させた繊維を傾斜スクリーン上にポンプで押し出す。液体を流出させるかまたは真空によって吸引しながら、該繊維をスクリーン表面でそれ自体を配向させ、乾燥シリンダー上でパッドとして乾燥させる。乾燥は、最終湿度が0.5~1.5重量%に達するまで125°Cで行う。面積重量6.0g/m<sup>2</sup>および厚さ0.45mmを有する物質が形成されるように、吸引および製造速度として2m/分を選択する。

【0052】b) カチオンポリマーによるガラス繊維パッドの含浸：ガラス繊維パッドにポリブレン(PolybrenR)(ビーエイスエフ(BASF)、ドイツ連邦共和国ルドヴィクシャフェン)の0.7%溶液を含浸させる。比含浸物吸收量は約37.0ml/m<sup>2</sup>である。ガラス繊維パッドは、1m/分の速度で80°Cで生成物移動式乾燥器中で乾燥させる。

【0053】c) 抗体によるガラス繊維パッドの含浸：実施例1b)と同様に(含浸物吸收量37.0ml/m<sup>2</sup>)、生理食塩水(濃度4mg/ml)に抗赤血球抗体(ダコパツ(Dakopatts))を入れた溶液をガラス繊維パッドに含浸させ、乾燥させる。

ば、フィルム層(1)の担体ホイルを介して肉眼で観察されるか、または試薬層中で形成された色素に基づく反射光測定法によって測定される。

【0046】本発明によって達成される長所は、実質的には、細胞成分が、予め希釈されずに、かつ妨害溶血を伴わずに全血から取り出され得ることである。赤血球に加えて、実質的に、白血球および血小板のような血液の全ての他の血球成分を分離することもできる。

【0047】本発明の血漿分離層は非常に効果的であるので、少量の血液試料からさえ血漿を迅速に単離することができる。

【0048】血漿分離層は、接触させる血液試料への妨害影響を有しないので、血液/血漿差異がその後の血漿成分の測定において確立されない、すなわち血液と血漿から得られる一致した値が得られるであろう。

【0049】以下の実施例において、本発明をさらに詳細に説明する。

【0050】

【実施例1】

1000リットル

2kg

0.04kg,

せる。1分の速度で生成物移動式乾燥器中で60°Cで乾燥させる。

【0054】d) レクチンによるガラス繊維パッドの含浸

リン酸塩緩衝化(1.25ミリモル/リットル)生理食塩水(濃度1mg/ml)にリシヌス・コミュニス(Ricinus communis)(RCA 120、ペーリンガー・マンハイム・ゲゼルシャフト・ミット・ベシュレンクテル・ハフツング(BoehringerMannheim GmbH)、ドイツ連邦共和国マンハイム)由来のレクチンを入れた溶液を、ガラス繊維パッドに含浸させ、実施例1c)と同様に乾燥させる。

【0055】e) 抗体およびカチオンポリマーによるガラス繊維パッドの含浸

実施例1c)と同様に、10mMヘペス(Hepes)緩衝液(pH 7.2)に0.7%ポリブレン(PolybrenR)および1mg/ml抗-赤血球抗体(ダコパツ(Dakopatts))を入れた溶液をガラス繊維パッドに含浸させ、乾燥させる。

【0056】

【実施例2】

血漿分離特性：実施例1で製造した本発明のガラス繊維

パッドの分離能は、 $6 \times 6\text{ mm}$ の分離パッドの表面全体を、面積重量 $2.5\text{ g/m}^2$ を有する $20 \times 6\text{ mm}$ の、血漿を移動させるガラス繊維パッド(ビンザー(Binzer)、ドイツ連邦共和国)の一端におくような器具で測定される。

【0057】4.8%のヘマトクリットを有する血液 $3.2\text{ ml}$ を分離パッド上にピペットによって移し、移動パッド上で2分後に赤血球フロント(erythrocyte front)を測定する。

血漿分離層	赤血球フロント (mm)	溶血 (g Hb/dl)
ポリビニルアルコール不含およびカチオンポリマー不含ガラス繊維	1~2	0.45
2%ポリビニルアルコール含有ガラス繊維	2.8	0.05
ポリブレン(PolybrenR)含有ガラス繊維	<0.2	0.3
2%ポリビニルアルコールおよびポリミン(Polymin)P含有ガラス繊維	<0.2	0.1
2%ポリビニルアルコールおよびポリブレン(PolybrenR)含有ガラス繊維	<0.2	0.01
ポリブレン(PolybrenR)含有紙(ワットマン(Whatman) 31 ET クロム(Chrom))(欧洲特許出願公開EP-A-0325413による)	血漿分離されない	
2%ポリビニルアルコールおよびレクチン含有ガラス繊維	<0.2	0.01
2%ポリビニルアルコールおよび抗体含有ガラス繊維	<0.2	0.01
2%ポリビニルアルコール、抗体およびポリブレン(PolybrenR)含有ガラス繊維	<0.2	測定可能な溶血なし

## 【0061】

【実施例3】血液および血漿中のカリウムを検出するために試験担体を使用する場合の血液/血漿差異3つの血漿分離層を製造し、各々、図1の試験担体上の層(3)として使用する。

## 【0062】血漿分離層:

a) 実施例1a)に従って製造した2%ポリビニルアルコール含有ガラス繊維(欧洲特許出願EP-A-0239002による)。

【0063】b) 2%ポリビニルアルコールおよびカチオンポリマー含有ガラス繊維(実施例1b)に従って製造した)。

【0064】 $6 \times 6\text{ mm}$ のパッドの形態の各血漿分離層を、 $6 \times 6\text{ mm}$ ポリアミド保護ネットの下でかつ実施例2

ビニルアセテート-マレイン酸ジブチルエステル-コポリマー(モウィリス(MowilithR) 35/73、ヘキスト・アクチエン・ゲゼルシャフト(Hoechst AG)、ドイツ連邦共和国フランクフルト) 14.7g  
2,2-ジフェニル-1-シアノ-アクリル酸-エチルヘキシル  
エステル(ユビヌル(UvinulR) N 539、ビーエイエスエフ(BASF), ドイツ連邦共和国ルドヴィークシャフェン) 18.4g  
4-(2,6-ジプロモ-4-ニトロフェニルアゾー)-2-オクタ  
デシルオキシナフトール-1(実施例3cに従って製造した)  
パリノマイシン 0.130g  
0.600g

【0058】さらに、血液 $1\text{ dl}$ を有する分離パッド2.2mgによって生じる溶血を測定する。

【0059】本発明のガラス繊維含有層を従来技術の血漿分離層と比較する。結果を表1に示す。本発明の血漿分離層だけが、顕著な溶血を伴わずに非常によく赤血球を分離する。

## 【0060】

【表1】

に記載した $20 \times 6\text{ mm}$ ガラス繊維パッド( $2.5\text{ g/m}^2$ 、ビンザー(Binzer)、ドイツ連邦共和国)の上で、熱間硬化型接着ストリップを介して、担体ホイルとしての長さ $150\text{ mm}$ および幅 $6\text{ mm}$ の白色ポリエステルホイルに接着する。

【0065】カリウム試験用試薬層として、分析物測定に必要な試薬で被覆した長さ $15\text{ mm}$ および幅 $6\text{ mm}$ の透明ポリエステルホイル(厚さ $200\text{ }\mu\text{m}$ )を、熱間硬化型接着ストリップを介して白色ポリエステルホイルに接着する。

【0066】試薬層の製造に関して、下記組成からなる混合物を湿厚 $300\text{ }\mu\text{m}$ で透明ポリエステルホイルに塗布し、乾燥させる。

## 【0067】

珪藻土(セラトム(Celatom<sup>R</sup>) MW 25、イーグル-ピッチャー(Eagle-Picher)、アメリカ合衆国シンシナティ)  
酢酸ブチル

28.2g  
50.7g

【0068】この層に、湿フィルム厚さ150μmを有する下記組成の第2の層を塗布し、乾燥する。

ヒドロキシセルロース(ナトロゾル(Natrosol<sup>R</sup>) 250G、ハーキュリーズ・インコーポレイテッド(Hercules Inc.)、アメリカ合衆国デラウェア州ウィルミントン)  
N,N-ビス-(ヒドロキシエチル)-アミノエタンスルホン酸  
エタノール

41.5g  
8.5g  
64ml

LiOHでpH 7.8に調節。

【0070】この試薬層を、15×6mmの小片に分割し後、上記試験担体と合わせる。

【0071】c) 4-[2,6-ジプロモ-4-ニトロフェニル)アゾ]-2-オクタデシルオキシー-1-ナフトール

【0072】c a) 2-オクタデシルオキシナフタレン攪拌器、冷却器および温度計を装着した4リットルの3つロフラスコ中、エタノール1リットルに水酸化ナトリウム(9.9%)4.8g(1.2モル)を入れた溶液に、2-ナフトール(9.8%)172.8g(1.2モル)を添加し、溶解した後、臭化n-オクタデシル417g(1.25モル)を添加し、反応混合物を還流下で14時間加熱する。さらにエタノール1リットルを添加した後、該熱溶液をサイツ(Seitz)フィルター上で吸引して、無機物質を除去し、弱いピンク色の濁液を30分間氷浴に置くことによって結晶化させる。ほとんど無色の結晶を吸引した後、濾過ケーキをエタノール約700mlで数回に分けて洗浄し、五酸化ニリンによって乾燥させた後、無色の結晶として2-オクタデシルオキシナフタレン371.9g(理論収率93.7%)を得た。Fp 64~68°C。

【0073】c b) 2-オクタデシルオキシー-1-ナフトール

攪拌器、クライゼン付属物、温度計および冷却器ならびに塩化カルシウム管を装着した10リットルの3つロフラスコ中、氷酢酸3リットルおよび無水酢酸600mlの混合物に、2-オクタデシルオキシナフタレン59.4g(1.5モル)および四酢酸鉛39.7g(0.75モル)を添加し、55°Cに加熱する。攪拌しながら、24時間おきに、4日にわたって、さらに四酢酸鉛400gを分けて(各100gずつ)添加する。その後、形成された黄色液体を室温に冷却し、水1.5リットルを添加した後、再度30分間攪拌し、形成された結晶スラリーを吸引し、水2リットルで数回に分けて洗浄する。湿粗生成物をトルオール4リットルに溶解し、水1リットルを分けて3回、飽和炭酸水素ナトリウム溶液1リットルを分けて3回、そして再度水1リットルを分けて3回、一緒に振盪する。硫酸ナトリウムによってトルオール相を乾燥させ、吸引および蒸発による濃縮の後、茶色の粗生成物63.5gを得、これを以下のとおりクロマトグラフィーで

【0069】

精製する: 得られた結晶をトルオール/イソヘキサン(5:2)1.3リットルの混合物に溶解し、該溶液を、内径11.5cm、充填高さ1.2mのシリカゲル60(メルク(Merck))カラムに入れる。移動溶媒としてトルオール/イソヘキサン(5:2)を使用し、画分約300mlを得る。画分9~52を合わせて、重量が一定になるまで蒸発によって濃縮する。2-オクタデシルオキシー-1-ナフトールアセテート324.2gを得る。Fp 67~68°C。さらに精製せずに、加熱しながら、これをメタノール1.8リットルに溶解し、20°Cに冷却する。形成された懸濁液に、冷却せずに攪拌しながら、濃硫酸93mlを15分以内で滴下する。これによって温度が35°Cに上昇する。次いで、還流下で2時間加熱し、次いで、氷浴で冷却し、氷飫で冷却しながらさらに30分間攪拌する。形成された結晶を吸引し、氷冷メタノール150mlで洗浄し、五酸化ニリンによって乾燥棚中で35°Cで乾燥させる。無色結晶の2-オクタデシルオキシー-1-ナフトール294.4g(理論収率47.5%)を得る。Fp 58~59°C。

【0074】c c) 4-[(2,6-ジプロモ-4-ニトロフェニル)アゾ]-2-オクタデシルオキシー-1-ナフトール

攪拌器、クライゼン付属物および温度計を装着した2リットルの3つロフラスコ中、攪拌しながら、10~15分間、濃硫酸300mlに亜硝酸ナトリウム22.7g(0.33モル)を入れる。これによって反応溶液の温度が35°Cに上昇する。次いで、20°Cに冷却し、氷で冷却しつつ温度を20~25°Cに維持するような方法で約15分で氷酢酸230mlを滴下する。その後、場合によって冷却しながら、10分間、2,6-ジプロモ-4-ニトロアニリン(リーデル・デ・ヘーン(Riedel de Haen)[99%GC])97.6ml(0.33モル)を数回に分けて添加する。これによって温度が19~21°Cに維持される。さらに3時間、再度、攪拌する。その後、氷水3.5リットル上に注ぎ、形成されたジアゾニウム塩溶液を、氷酢酸3リットルおよびクロロホルム300mlに酢酸ナトリウム・三水和物180g(1.33モル)を添加した混合物に2-オクタデシルオキシー-1-ナフトール124g(0.3モル)を入れた溶液に迅速に添加する。(ナフトールエーテルの溶液の製造において、酢酸ナトリウ

ムを添加して氷酢酸-クロロホルム中に加えた後、温度が約45°Cに上昇した後、20°Cに再度冷却することに注意しなければならない。) 氷浴中で3時間攪拌した後、形成した結晶を吸引し、残渣を毎回水500mlで3回洗浄し、40°Cで乾燥棚中で乾燥させる。粗生成物-淡茶色結晶295.5g-をクロマトグラフィーによって精製する。アゾ化合物をトルオール/塩化メチレン(2:5)1リットルに溶解し、内径11.5cm、充填高さ1.2mのシリカゲル60(メルク(Merck))に充填し、トルオール/塩化メチレン(2:5)で溶離する。画分約70mlが得られる。画分57~173を合わせて、蒸発によって濃縮する。茶色の結晶134.2gを得る。これを80°Cでトルオール480mlに溶解し、65°Cに冷却し、強く攪拌しながらイソヘキサン800mlを添加する。強く攪拌しながら20°Cに冷却し、冷蔵庫中に一晩放置し、形成された結晶を吸引し、濾過ケーキを氷冷トルオール/イソヘキサン(1:1.3)300mlで2回洗浄し、次いで、イソヘキサン300mlで洗浄する。その後、重量が一定なるまで五酸化ニリンによって40°Cで乾燥棚中で乾燥させる。淡茶色結晶のアゾ化合物119.9g(理論収率55.5%)を得る。Fp 102~103°C。TLC、シリカゲル60(メルク(Merk))、移動溶媒:トルオール/塩化メチレン(2:5)、Rf=0.38。o-ニトロフェニルオクチルエーテル中、酸性またはアルカリ性pHでの透過分析によって、454または672nmのλ<sub>max</sub>値が得られる。

【0075】血液/血漿差異を評価するために、同一の試験担体を用いて、全血および通常のように遠心分離によって血液から得た血漿を研究する。試料30μlを保護層(4)にピペットで移し、次いで、各試験担体を市販の反射光度計レフロトロン(Reflotron<sup>R</sup>)(ベーリング

ー・マンハイム・ゲゼルシャフト・ミット・ベシュレンクテル・ハフツング(Boehringer Mannheim GmbH)、ドイツ連邦共和国マンハイム)中に挿入する。反射光度計において、フラップの上の試薬層を移動層中の液体と接触させ、生じた反応を反射光度計によって測定する。

【0076】結果を図2および図3に示す。従来技術のガラス繊維パッドを使用すると、顕著な血液/血漿差異が観察され、本発明の血漿分離層を使用する試験担体は、血液からおよび血漿からの分析物の測定に適している。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明の血漿分離層を含んでいる試験担体の斜視図である。

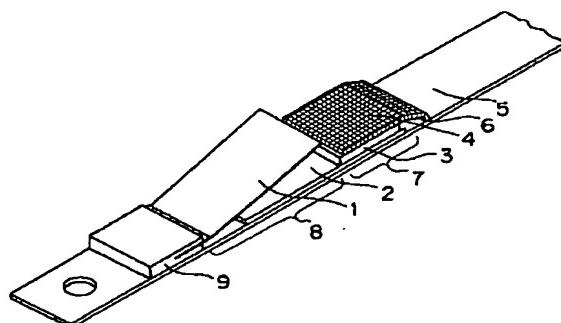
【図2】 血液および血漿に関して、分離層として従来技術のガラス繊維を用いた試験担体で測定される反射率と分析物濃度の間の関係を表す曲線である。

【図3】 血液および血漿に関して、本発明の分離層を有する試験担体で測定される反射率と文節物濃度の間の関係を表す曲線である。

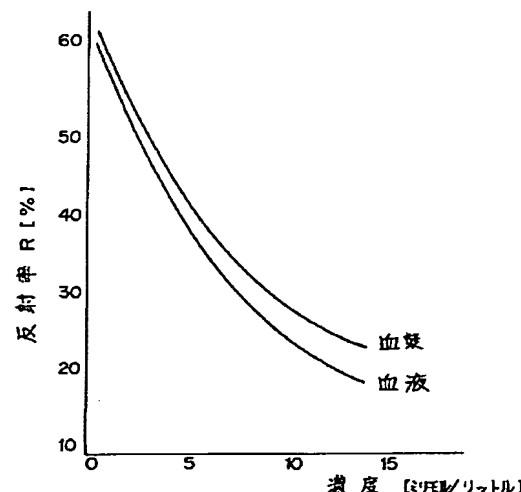
#### 【符号の説明】

- 1 … フィルム層
- 2 … 移動層
- 3 … 分離層
- 4 … 保護層
- 5 … 不活性担体ホイル
- 6 … 熱間硬化型接着剤のストリップ
- 7 … 試料適用域
- 8 … 試験域
- 9 … 接着部

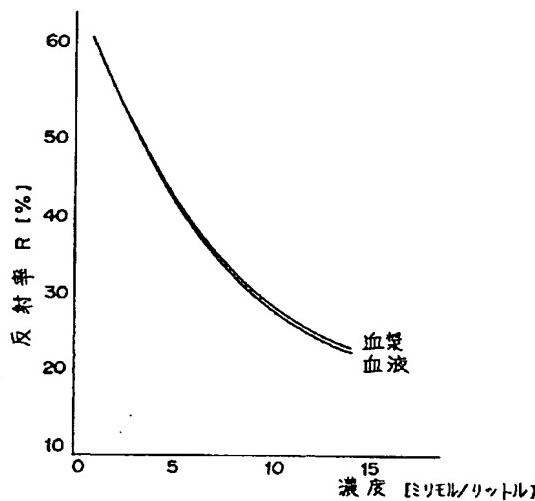
【図1】



【図2】



【図3】



## フロントページの続き

(72)発明者 ベーター・フォーゲル  
 ドイツ連邦共和国デー-6944ヘムスバツ  
 ハ、シユーベルトヴエーク5番  
 (72)発明者 ロルフ・レルヒ  
 ドイツ連邦共和国デー-6804イルベシヤイ  
 ム、カンツエルバツハシュトラーセ22番

(72)発明者 エリツヒ・シュナイダー  
 ドイツ連邦共和国デー-6800マンハイム  
 31、メルカー・クヴエーアシユラーク6番  
 (72)発明者 アンドレアス・マーシヤル  
 ドイツ連邦共和国デー-6800マンハイム  
 31、レフコーアエンヴエーク18番